

09/659,

File

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-168356

(43) 公開日 平成7年(1995)7月4日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 3 F 7/027				
C 0 7 K 17/14		8318-4H		
C 0 8 G 69/48	NRH			
G 0 3 F 7/004	5 0 3			
7/038				

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平5-317119

(22) 出願日 平成5年(1993)12月16日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年11月25日～
11月28日 日本化学会主催他4社共催の「第12回固体・
表面光化学討論会」において文書をもって発表

(71) 出願人 390014535

新技術事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 一ノ瀬 暢之

千葉県市原市姉崎741-5 コンフォート

姉崎B2-1

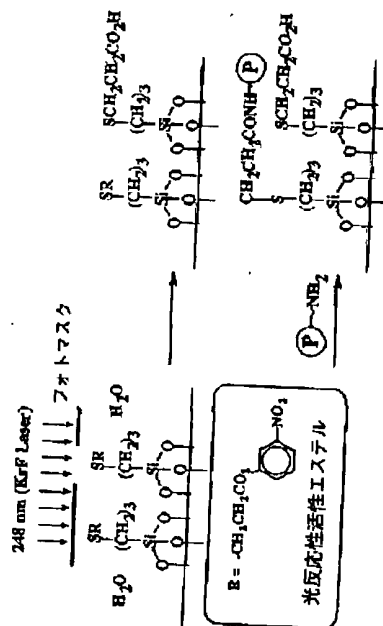
(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 含窒素高分子化合物の固定化方法

(57) 【要約】

【目的】 簡便な操作で、光パターニングを可能とする含窒素高分子化合物の固定化法を提供する。

【構成】 チオール基により表面修飾した固体表面をアクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体により反応処理し、光パターニングを行い、ついで含窒素高分子化合物を反応させ、露光されていないマスク領域に固定化する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 チオール基により表面修飾した固体表面をアクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体により反応処理し、次いで含窒素高分子化合物を反応させて固定化することを特徴とする含窒素高分子化合物の固定化方法。

【請求項2】 請求項1の方法において、アクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体による反応処理後に光パターンニングを行い、次いで含窒素高分子化合物を反応させて、露光されていないマスク領域に固定化することを特徴とする含窒素高分子化合物の固定化方法。

【請求項3】 含窒素高分子化合物がタンパク質である請求項1または2の含窒素高分子化合物の固定化方法。

【請求項4】 光反応性二価性架橋試剤としてのアクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体。

【請求項5】 請求項4の架橋試剤としてのアクリル酸3-ニトロフェニルエステル。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、含窒素高分子化合物の固定化方法に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、光パターンニングやその複合化によって固体表面にタンパク質等の含窒素高分子化合物を固定化し、重合不溶化することも可能とする新しい含窒素高分子化合物の固定化方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術とその課題】近年、分子素子、機能性薄膜等としてタンパク質等の含窒素高分子化合物を固体表面に固定化することが注目されており、そのための手法についての検討が進められてもいる。従来、タンパク質の固定化、重合不溶化などのためには、あらかじめ固体表面をチオール基によって修飾し、次いでメルカプト基とアミノ基の両方に対し反応性をもつ二価性架橋試剤（クロスリンキング試剤）を用いて表面とタンパク質、あるいはタンパク質同士を結合させるのが一般的な手法とされてきた。たとえば、ガラスなどの表面へタンパクの微小なパターンを形成するためには、1) 遠紫外線（ $<200\text{nm}$ ）照射によるチオール基の光パターンニングとN-マレイミド酸ヒドロキシスクシンイミドエステル等の架橋剤の組み合わせ（J. Am. Chem. Soc., 114, 4432 (1992)；米国特許第5077, 210明細書参照）や、2) ベンゾフェノン分子内にもつ光反応性二価性架橋試剤で処理した基板のタンパク質存在下での紫外線（ 365nm ）照射による固定化方法（Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 759 (1992)）、3) 光によってビオチン機能を発現する試剤を用いたビオチン-アビジンの特異的吸着による方法（Biophys. J. 61, 1171 (1992)）などが知られている。また、その他としては、4) 芳香族アジドを基本とした光反応性二価性架橋試剤が米国MolecularProbes社

から市販されてもいる。

【0003】しかしながら、上記1)方法では、タンパク質の固定に際して、光反応後、チオールを充分還元した後クロスリンキング試剤処理を行う必要があるため、2段階の操作となり、能率が悪く、精度にも限界がある。一方、2)および4)の方法では光によって発生する活性種の官能基選択性がないために、酵素などのタンパク質に適用する際にその機能を損ないかねないという問題がある。さらにまた、3)の方法ではビオチン-アビジンの特異性のための用途が制限されるという問題がある。

【0004】このため、従来の方法によっては、所要のパターン形成をも可能とする汎用性のある高精度での含窒素高分子化合物の固定化方法は実現されていなかった。そこで、この発明は、以上の通りの従来技術の欠点を解消するためになされたものであって、簡便な操作で的確にパターンニング等による固定化を可能とすることのできる、新しい含窒素高分子化合物の固定化方法を提供することを目的としている。

【0005】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記の課題を解決するものとして、チオール基により表面修飾した固体表面をアクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体により反応処理し、次いで含窒素高分子化合物を反応させて固定化することを特徴とする含窒素高分子化合物の固定化方法を提供する。

【0006】そして、この発明は、上記方法において、アクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体による反応処理後に光パターンニングを行い、次いで含窒素高分子化合物を反応させて、露光されていないマスク領域に固定化することを特徴とする方法も提供する。これらの方法において、含窒素高分子化合物としては特にその種類に制約はなく、ポリアミン、ポリイミン、ポリアミド、ポリウレタン、尿素ポリマー等をはじめ、ポリペプチド、タンパク質の任意のものがその対象となる。固体表面についても特にその種類に限定はない。金属、合金、ガラス、セラミックス、シリコン等の半導体、ポリマー等の各種のものが対象となる。この固体表面は、チオール基により修飾するが、この場合、たとえば、ガラス等の場合にはメルカプト置換アルキルシランによって処理し、表面にチオール基修飾することができる。

【0007】アクリル酸ニトロフェニルエステルまたはその誘導体は、光反応性の二価架橋試剤として作用するものである。この場合、たとえば具体的には、アクリル酸3-ニトロフェニルエステル、アクリル酸4-ニトロフェニルエステル、アクリル酸3-ニトロ-4-メチルフェニルエステル、アクリル酸3-ニトロ-5-メチルフェニルエステル、アクリル酸3-ニトロ-4-クロロフェニルエステル、アクリル酸3-ニトロ-4-メトキシフェニルエステル、アクリル酸3-メチル-4-ニト

ロフェニルエステル、メタクリル酸3-ニトロフェニルエステル等が例示される。

【0008】

【作用】この発明においては、光反応性二価性架橋試剤としてのアクリル酸3-ニトロフェニルエステルまたはその誘導体は、エステル部が活性エステルとなっておりアミノ基に対して高い選択性でアミド結合を形成するとともに、水の存在下、紫外線(<365nm)照射により加水分解しカルボン酸となりアミノ基等の含窒素基に対して反応性を失う。一方、アクリル酸エステルによける二重結合はメルカプト基に対して選択的に付加反応を行いチオエーテル(スルフィド)結合を形成する。このことから、この試剤化合物を固相材料表面に応用する場合には、光照射を行わない領域ではタンパク質などのアミノ基をもつ高分子化合物を固定化でき、光照射部分はカルボン酸基の生成により親水性になるためこれらの高分子化合物の吸着は抑えられることとなる。この性質を利用してこの発明では、タンパク質などのアミノ基をもつ高分子化合物の固相材料表面上への光パターンニングやその複合化などが可能となる。また、たとえば、タンパク質の電気泳動パターンからの選択的なパターンの

基板への転写(電気泳動によって分離した種々のタンパク質から任意のものを基板へ固定化する)等への応用も可能となる。

【0009】以下、実施例を示し、さらに詳しくこの発明の方法について説明する。もちろん、この発明は、以下の例によって限定されることはない。

【0010】

【実施例】

試験例

(アクリル酸3-ニトロフェニルエステルの光加水分解) アクリル酸3-ニトロフェニルエステル3mgをベータシクロデキストリン26mgを用いて水4mLに可溶化させた溶液に紫外レーザー光(248nm)を照射したところ、図1に示した通り、溶液の吸収スペクトルの300-400nm領域に3-ニトロフェノールに基づく吸収が現われた。この吸収は照射を続けると増大したことから、3-ニトロフェノールはアクリル酸3-ニトロフェニルエステルの光加水分解によって生成したも

のと考えられる。

実施例1

(ガラス基板上へのポリエチレンイミンのパターニング) 3-メルカプトプロピルトリメトキシシランにより処理したガラス基板をアクリル酸3-ニトロフェニルエステル35mgを10mLのアセトニトリルに解かした溶液中に12時間含浸し反応させ、アセトニトリルで洗浄、乾燥させた。この際の反応は、図2に従っているものと考えられる。そこで、続いて、この基板に、図3に示した態様としてフォトマスクを密着させ、純水中で紫外レーザー光(248nm)を照射した。さらにこの基板をポリエチレンイミン水溶液(0.1%)と12時間反応させた後、テトラメチルローダミンイソシアナートで蛍光ラベル化した。基板表面を蛍光顕微鏡で観察したところ、フォトマスクの部分が蛍光パターンとなって観察された。

【0011】このことは、図3において、光照射により露光されていない領域にポリエチレンイミンがアミド結合により結合されたことを意味している(図中のPは、ポリエチレンイミン鎖を示している)。

実施例2

(アルブミンのパターニング) 実施例1と同様にして、アルブミンを用いて光パターンニングによるアルブミンのガラス基板上への固定を行った。

【0012】同様に、蛍光ラベルによる蛍光顕微鏡により、フォトマスク部分が蛍光パターンとして観察された。

【0013】

【発明の効果】以上詳しく説明した通り、この発明により、簡便な操作で、精度の良い含窒素高分子化合物としてのタンパク質等のパターンニングとその複合化が可能となる。

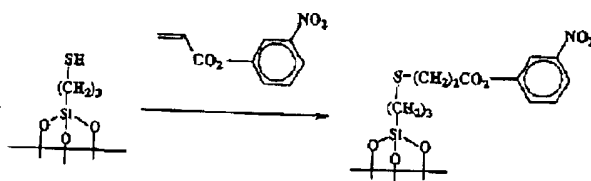
【図面の簡単な説明】

【図1】アクリル酸3-ニトロフェニルエステルの光加水分解を示した吸収スペクトル図である。

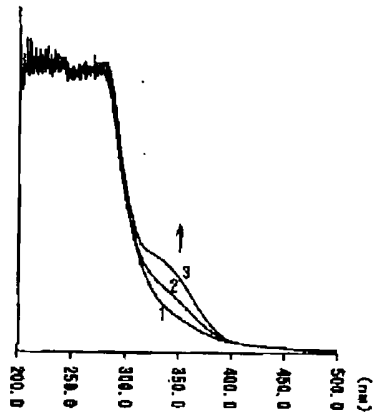
【図2】アクリル酸3-ニトロフェニルエステルのチオール基との反応を示した化学反応式図である。

【図3】図2の反応後の光パターンニングと含窒素化合物の固定化を示した化学反応式図である。

【図2】



【図1】



【図3】

